UNTERSUCHUNG DER PREGNANDIOL-GLUCURONYLTRANSFERASE DER RATTENLEBER: IHRE MULTIPLIZITÄT UND ALTERSABHÄNGIGKEIT

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
MICHAEL FUCHS
aus
KOBLENZ

BONN 1976

UNTERSUCHUNG DER PREGNANDIOL-GLUCURONYLTRANSFERASE DER RATTENLEBER: IHRE MULTIPLIZITÄT UND ALTERSABHÄNGIGKEIT

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

MICHAEL FUCHS

aus

KOBLENZ

BONN 1976

Angefertigt mit Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. H. Breuer

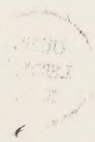
2. Referent: Prof. Dr. H. J. Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 15.7.76

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

UNIV. LEIDEN BIBL.

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0065

Dankvermerk

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Biochemie der Universität Bonn unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Breuer im März 1975 begonnen und im Mai 1976 zu Ende geführt.

Meinem Lehrer, Herrn Professor Dr. H. Breuer, danke ich für die Überlassung des Themas und für seine wohlwollende Unterstützung und Hilfe, die er mir zuteil werden ließ.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. G. S. Rao und Frau Dr. M. L. Rao, die mir mit wertvollen Anregungen und vorbildlicher Kollegialität stets behilflich waren.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Zusammenfassung	8
2.	Einleitung	9
3.	Material und Methoden	12
3.1.	Chemikalien	12
3.2.	Herstellung der Mikrosomenfraktion	13
3.3.	Charakterisierung des Pregnandiol-glucuronides	13
3.3.1.	Extraktion und Chromatographie	13
3.3.2.	Spaltung mit ß-Glucuronidase	14
3.3.3.	Doppelisotopenbestimmung der Glucuronidierung mit [1,2-$^{3}H_2$] Pregnandiol und [U-^{14}C] UDPGA	15
3.4.	Aktivitätsbestimmung der Pregnandiol-Glucuronyltransferase	16
4.	Ergebnisse und Diskussion	18
4.1.	Nachweis und Kinetik der Glucuronyltransferase	18
4.1.1.	Charakterisierung des gebildeten Pregnandiolglucuronides	18
4.1.2.	Statistische Analyse der Bestimmungsmethode	22
4.1.3.	Stabilität des Enzyms	23
4.1.4.	Abhängigkeit der Glucuronidbildung von der Proteinmenge	24
4.1.5.	Einfluß des pH-Wertes auf die Glucuronidierung	25
4.1.6.	Abhängigkeit der Glucuronidierung von der Inkubationszeit	27

4.1.7.	Aktivatoren und Inhibitoren	28
4.1.7.1	Einfluß von Kationen und EDTA	28
4.1.7.2.	Einfluß von Sulfhydryl-Reagentien	29
4.1.7.3.	Einfluß von Nukleotiden	30
4.1.8.	Untersuchung von Initialgeschwindigkeiten	33
4.2.	Untersuchungen zur Multiplizität der Glucuronyltransferasen	39
4.2.1.	Hemmversuche mit Aglykonen	39
4.2.1.1.	Versuche mit Pregnandiol-strukturanalogen Verbindungen	39
4.2.1.2.	Hemmversuche mit Bilirubin und Xenobiotica	42
4.2.2.	Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Glucuronyltransferase mit Östron, Pregnandiol und Testosteron als Substraten	44
4.2.3.	Untersuchung der Altersabhängigkeit der mikrosomalen Glucuronyltransferasen	49
5.	Schlußfolgerungen	53
6.	Literaturverzeichnis	56

1. Zusammenfassung

Die Mikrosomenfraktion der Leber geschlechtsreifer, weiblicher Ratten glucuronidiert neben anderen Steroidhormonen auch Pregnandiol. Das Enzym wird durch Mg^{2+}, Ca^{2+} und Fe^{2+} stimuliert. p-Chlormercuribenzoat und N-Äthylmaleimid stimulieren in niedrigen Konzentrationen, Dithioerythrithol hemmt das Enzym schwach. 1 mM ATP stimuliert um 73 %, UDP hat in Konzentrationen bis 1 mM keinen Einfluß auf das Enzym. Die Michaelis-Menten Konstante für UDPGA beträgt 60,8 µM, die für Pregnandiol beträgt 0,84 µM. Östron, Pregnanolon, Ätiocholanolon und 11-Deoxy-tetrahydrocortison hemmen die Glucuronidierung von Pregnandiol kompetitiv; Bilirubin und Phenolphthalein hemmen nicht-kompetitiv. Testosteron, Tetrahydrocortison, Tetrahydrocorticosteron, o-Aminophenol und p-Nitrophenol haben keinen Einfluß auf die Glucuronidierung. Die Aktivierungsenergie beträgt 18,0 Kcal. Die Glucuronyltransferasen für Bilirubin, Östron, Testosteron und Pregnandiol wurden auf ihre Altersabhängigkeit untersucht. Die Aktivitätsmaxima der Transferasen sind für Bilirubin nach 21, Östron nach 21, Testosteron nach 37 und Pregnandiol nach 65 Tagen erreicht. Diese Ergebnisse zeigen, daß sich die Glucuronyltransferasen unterschiedlich entwickeln; sie geben einen Hinweis darauf, daß die verschiedenen Substrate von unterschiedlichen Glucuronyltransferasen glucuronidiert werden.

2. Einleitung

Die Glucuronidierung ist einer der wesentlichsten Stoffwechselschritte zur Ausscheidung endogener Substrate und Xenobiotica wie z. B. Arzneimittel. Sie beruht auf folgender Reaktion:

$$R\text{-}OH + \text{UDP-Glucuronsäure} \longrightarrow R\text{-}O\text{-Glucuronsäure} + UDP$$

Auch Steroidhormone werden als Glucuronide ausgeschieden. Die Glucuronidierungsreaktion wird durch ein mikrosomales Enzym (UDP-Glucuronyltransferase EC 2.4.1.17.), das in Leber, Darm und Niere von Säugetieren vorkommt, katalysiert. Dieses Enzym besitzt sowohl eine große Spezifität für UDPGA als auch für die zu glucuronidierenden Aglykone (1). So konnte Le Grande et al. (2) und Miller et al. (3) die Konjugierung von Tetrahydrocortison und Tetrahydrocortisol sowohl in der Rattenleber als auch in Schaf- und Hundelebern nachweisen. Drucker (4) fand, daß Tetrahydrocortison auch von den homozygoten Gunn-Ratten konjugiert wird, die für viele Substrate wie z. B. o-Aminophenol, o-Aminobenzoesäure und Bilirubin Glucuronidierungsdefekte haben. Neben der Leber weisen auch der Dünndarm und die Niere eine beträchtliche Glucuronidierungskapazität auf, wie durch vergleichende Untersuchungen mit Östron, Östradiol-17ß und Östriol mit dem 8000 x g Überstand dieser Organe bei Schweinen gezeigt werden konnte (5). Vollrath gelang es mit Hilfe von Detergentien, das Enzym des Schweinedünndarmes zu solubilisieren (6); das Molekulargewicht dieser Enzymfraktion betrug 50.000 Dalton oder n x 50.000, wobei n 2 - 6 betrug. Rao (7) analysierte kinetische Eigenschaften und Reaktionsmechanismus einer Östron-Glucuronyltransferase der mikrosomalen Fraktion der Schweineniere.

Nachdem also von mehreren Gruppen sowohl Corticosteroide als auch Östrogene als Substrate untersucht worden waren, stellte sich die Frage, in welchem Organ der Ratte die Glucuronidierung von Metaboliten der Gestagene (Progesteron) vonstatten geht. Hierin besitzt die untersuchte Substanz, Pregnandiol, der Hauptmetabolit des Progesteron eine Schlüsselposition.

Pregnandiol wurde aber auch noch aus einem anderen Grund für diese Untersuchungen ausgewählt. Wie bei Arias et al. (8 - 10 beschrieben, hat das mit der Muttermilch ausgeschiedene Pregnandiol einen hemmenden Einfluß auf die Konjugierung von Bilirubin beim Neugeborenen. Pregnandiol wird als ein Faktor der Pathogenese des Icterus neonatorum betrachtet. Auch das Vorhandensein vergleichsweiser hoher Konzentrationen von Östrogenen im Plasma von Neugeborenen könnte eine Erklärung für das Auftreten der Neugeborenen-Hyperbilirubinämie sein (11 - 12). Von Adlard und Lathe (13) wurde Pregnandiol als Inhibitor der Bilirubin-Glucuronyltransferase eingesetzt; diese 'in vitro'-Versuche ergaben allerdings keine eindeutigen Hinweise auf eine Hemmung.

In der vorliegenden Arbeit sollte festgestellt werden, ob die Rattenleber Pregnandiol glucuronidiert. Weiterhin war zu untersuchen, ob andere Aglykone, von denen z. T. bisher bekannt ist, daß sie in der Leber glucuronidiert werden können, von dem gleichen Enzymsystem konjugiert werden, oder ob unterschiedliche Glucuronyltransferasen für die verschiedenen Aglykone vorhanden sind. Es wäre festzustellen, zu welchem Zeitpunkt post partum die Glucuronyltransferase voll entwickelt ist, insbesondere in Relation zu Bilirubin. Die Frage, ob die Kapazität der Bilirubin-Glucuronyltransferase in Gegenwart von anderen Aglykonen ausreicht, wurde auch von Dutton (14) untersucht. Die Herabsetzung der Transferaseaktivität durch Pharmaka kann nach seiner Meinung möglicherweise die Entstehung des

Icterus neonatorum beeinflussen.

Wenn die Pregnandiol-Glucuronyltransferase in der juvenilen Leber noch insuffizient ist, und Bilirubin die Pregnandiolglucuronidierung hemmt, dann könnte eine vermehrte Pregnandiolexkretion durch die Muttermilch unter Umständen eine Hyperbilirubinämie beim Neugeborenen durch kompetitive Hemmung der Bilirubin-Glucuronyltransferase bewirken. Insbesondere würde dies zutreffen, wenn die Kapazität der juvenilen Rattenleber zur Glucuronidierung von Bilirubin noch nicht ausgereift wäre.

Zur Klärung der aufgeworfenen Fragen mußte eine Mikrosomenfraktion hergestellt werden, die unter den gegebenen Bedingungen nur eine meßbare Reaktion, nämlich die Glucuronidierung von Pregnandiol in Gegenwart von UDPGA katalysierte. Das entstandene Produkt mußte zweifelsfrei charakterisiert werden. Eine Bestimmungsmethode, die schnell, zuverlässig und reproduzierbar war, mußte entwickelt werden, um die Eigenschaften (Kinetische Daten) des Enzyms festzustellen. Hemmversuche, bei denen Pregnandiol in Gegenwart von anderen Aglykonen inkubiert wurde, sollten Aufschluß über die Multiplizität der Glucuronyltransferase geben. Vergleichende Untersuchungen der Glucuronidierungskapazität von neugeborenen bis erwachsenen Tieren mit Östron, Testosteron, Bilirubin und Pregnandiol würden a) Auskunft über die Entwicklung des (der) Enzym (e) geben und b) in eine eventuelle Multiplizität der Glucuronyltransferasen Einblick gewähren.

Es konnte festgestellt werden, daß die Rattenleber Pregnandiol konjugiert; dieses Enzymsystem ist nicht identisch mit demjenigen, welches die obengenannten Aglykone glucuronidiert. Die Pregnandiol-Glucuronyltransferase ist im Gegensatz zu anderen Glucuronyltransferasen erst zwischen dem 60. und 65. Lebenstag der jungen Ratten voll entwickelt.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

[1,2-$^{3}H_{2}$] Pregnandiol (48.6 mCi/mmol, New England Nuclear Corporation, Boston, USA), [4-^{14}C] Östron (58 mCi/mmol, [4-^{14}C] Testosteron (58 mCi/mmol und Uridin-5- [U-^{14}C] diphosphoglucuronsäure, Ammoniumsalz (225 mCi/mmol, Radiochemical Center, Amersham, Bucks, England) und Uridin-5-diphosphoglucuronsäure (Boehringer, Mannheim) waren Handelspräparate. Pregnandiol-3-glucuronid wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Röhle, Bonn, zur Verfügung gestellt; die Synthese erfolgte modifiziert nach Hübner et al. (15). Alle weiteren Reagenzien waren von p.a. Reinheitsgrad. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden frisch destilliert. Zur Herstellung der Puffer wurde glasdestilliertes Wasser, das vor Gebrauch zusätzlich durch einen Mischbettionenaustauscher geleitet wurde, verwandt. Alle radioaktiven Substanzen wurden vor Gebrauch dünnschichtchromatographisch auf Reinheit geprüft und gegebenenfalls gereinigt.

Die folgenden Abkürzungen wurden benutzt:

3α,20α-Dihydroxy-5ß-pregnan	Pregnandiol
20α-Hydroxy-5ß-pregnan-3-α glucuronid	Pregnandiolglucuronid
3α-Hydroxy-5ß-pregnan-20-on	Pregnanolon
3α- Hydroxy-5ß-androstan-17-on	Ätiocholanolon
3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17-on	Östron
3α,11ß,21-Trihydroxy-5ß-pregnan-20-on	Tetrahydrocorticosteron
3α,17α,21-Trihydroxy-5ß-pregnan-11,20-dion	Tetrahydrocortison
3α,17α,21-Trihydroxy-5ß-pregnan-20-on	11-Deoxy-Tetrahydrocortis
17ß-hydroxy-4-androsten-3-on	Testosteron
Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure	UDPGA
Uridin-5'-diphosphat	UDP
Adenosintriphosphat	ATP
p-Chlormercuribenzoat	pCMB
N-Äthylmaleimid	NEM

3.2. Herstellung der Mikrosomenfraktion

Zur Untersuchung der Kinetik der Pregnandiol-Glucuronyltransferase wurden weibliche Wistar-Ratten (Ivanovas, Kissleg, Allgäu), die 2 bis 3 Monate alt waren und 170 bis 210 g wogen, verwendet. Die Untersuchung der Entwicklung des Enzyms in der Leber wurde mit neugeborenen bis geschlechtsreifen weiblichen Wistar-Ratten durchgeführt. Die Tiere erhielten Futter (Höveler Standard, Immingrath, Rheinland) und Wasser ad libitum. Nach der Dekapitation der Tiere wurde die Leber herausgenommen und mit eiskaltem 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, der 0,25 M Saccharose enthielt (Aufarbeitungspuffer), abgespült. Anschließend wurde die Leber in 9 Teilen Aufarbeitungspuffer dreimal je 10 sec mit einem Ultra Turrax (Janke und Kunkel KG, Staufen im Breisgau) homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 600 x g zentrifugiert (Christ Zeta 20 Kühlzentrifuge). Das Sediment wurde verworfen. Der Überstand wurde 10 min bei 25.000 x g zentrifugiert, um die Mitochondrien und Lysosomen zu entfernen. Der Überstand wurde 30 min bei 150.000 x g zentrifugiert (L2-65B Ultrazentrifuge, Beckmann Instruments, München). Die Mikrosomen wurden im Aufarbeitungspuffer suspendiert und nochmals 30 min bei 150.000 x g zentrifugiert (gewaschene Mikrosomenfraktion). Portionen der mikrosomalen Suspension wurden bei - 20°C für weitere Untersuchungen aufgehoben.

3.3. Charakterisierung des Pregnandiolglucuronides

3.3.1. Extraktion und Chromatographie

Zur Charakterisierung des gebildeten Pregnandiolglucuronides wurde ähnlich der Charakterisierung von Östradiol-17ß-3-glucuronid wie bei Rao et al. (16) erwähnt, verfahren. 30 nmol Pregnandiol, entsprechend 0,5 µCi $[1,2\text{-}^{3}H_{2}]$ Pregnandiol, wur-

den mit 1,5 mmol UDPGA und 200 µg Protein der Mikrosomenfraktion in 0,15 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, 60 min inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben in Eiswasser gekühlt. Nichtumgesetztes Pregnandiol wurde viermal mit je 5 ml wassergesättigtem Äthylacetat ausgeschüttelt. Das gebildete Glucuronid wurde aus der mit NaCl gesättigten Phase dreimal mit je 1 ml wassergesättigtem n-Butanol extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten n-Butanol-Extrakte abgedampft. Der Rückstand wurde in 5 Tropfen Chloroform : Methanol (3:7; v/v) aufgenommen und nach Zugabe von 5 µg nicht-radioaktivem Pregnandiolglucuronid auf Dünnschichtplatten (Kieselgel 0,25 mm, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Das Chromatogramm wurde mit Chloroform : Methanol (3:7; v/v) entwickelt. Das radioaktive Produkt wurde mit einem Dünnschichtscanner (DC-Scanner II, LB2723, Berthold) gezählt, der zugesetzte Standard wurde durch Anfärben mit Antimontrichlorid in Chloroform sichtbar gemacht.

3.3.2. Spaltung mit ß-Glucuronidase

Das nach 3.3.1. chromatographierte Produkt wurde mit 10 ml Chloroform : Methanol (3:7; v/v) von der Platte eluiert. Das Extraktionsmittel wurde im Vakuum abgedampft. Zu dem Rückstand wurden 5 mg ß-Glucuronidase (entsprechend 1750 Fishman-Einheiten; Schering Berlin) in 1 ml Acetatpuffer, pH 5,0, gegeben. Dieses Gemisch wurde 20 h unter konstantem Schütteln bei 37°C unter Luft inkubiert. Die wässrige Lösung wurde dreimal mit je 2 ml Äthylacetat extrahiert. Der Extrakt wurde mit 10 µg Pregnandiol als internem Standard versetzt; diese Lösung wurde auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und mit Chloroform : Methanol (3:7, v/v) entwickelt.

3.3.3. Doppelisotopenbestimmung der Glucuronidierung mit [1,2-$^3H_2$]Pregnandiol und [U-^{14}C]UDPGA

Zur weiteren Abklärung der Identität des gebildeten Pregnandiolglucuronides wurde eine Doppelisotopenbestimmung durchgeführt. Dabei wurden drei Inkubationsansätze hergestellt:

Zu 100 nM Pregnandiol und 0,5 mM UDPGA wurden
0,5 µCi [1,2$^3H_2$] Pregnandiol (I)
1,0 µCi [U-^{14}C] UDPGA (II)
0,5 µCi [1,2$^3H_2$] Pregnandiol und 1,0 [U-^{14}C] UDPGA (III)
gegeben. Jeder Probe wurden 500 µg Protein, 100 µl $MgCl_2$ (Endkonzentration 10 mM) und ad 2 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, zugesetzt. Es wurde unter konstantem Schütteln 2 h bei 37°C unter Luft inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kühlen in Eiswasser gestoppt. Nach Aussalzen mit NaCl wurde dreimal mit je 2 ml wassergesättigtem n-Butanol extrahiert. Die auf diese Art von jeder Inkubation gewonnenen vereinigten Extrakte wurden, wie in 3.3.1. beschrieben, abgedampft, in Chloroform : Methanol (3:7; v/v) aufgenommen und auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Parallel dazu wurden 5 µg Pregnandiolglucuronid und Pregnandiol aufgetragen. Nach Entwicklung der Platten in Chloroform : Methanol (3:7; v/v) wurde die vorhandene Radioaktivität, wie in 3.3.1. beschrieben, gezählt. Das parallel aufgetragene nicht-radioaktive Pregnandiolglucuronid wurde mit Antimontrichlorid in Chloroform angefärbt. Die mit dem nicht-radioaktiven Pregnandiolglucuronid parallel verlaufenden Gipfel wurden dreimal mit je 5 ml Chloroform : Methanol (3:7; v/v) eluiert. Das Elutionsmittel wurde eingedampft und die Rückstände in je 0,5 ml Methanol gelöst. Diese methanolischen Lösungen wurden in einem Oxymat (Oxymat, Ja 104, Deutsche Intertechnique, Mainz) verbrannt. Anschließend wurden die erhaltenen Proben in einem Flüssigkeitsscintillationsspektrometer (Mark II, Nuclear Chicago) gezählt.

3.4. Aktivitätsbestimmung der Pregnandiol-Glucuronyltransferase

Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms wurde nach Rao et al. (17) durchgeführt; die Methode wurde in einigen Punkten verändert. [1,2-$^3H_2$] Pregnandiol wurde mit nicht-radioaktivem Pregnandiol auf eine Konzentration von 30.000 Ipm pro 30 nmol in 0,1 ml Äthanol eingestellt. 0,1 ml dieser Lösung wurde zusammen mit 1 Tropfen Propylenglykol in ein Inkubationsröhrchen pipettiert. Das Äthanol wurde bei 50°C mit nachgereinigtem Stickstoff verdampft. Zu dem Rückstand wurden nacheinander 0,5 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,3 (Inkubationspuffer), 0,1 ml 10 mM $MgCl_2$-Lösung und 0,2 ml UDPGA in Inkubationspuffer (Endkonzentration 1 mM) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 ml der Enzymlösung (15-150 µg der gewaschenen Mikrosomenfraktion im Aufarbeitungspuffer) gestartet. Die Proben wurden 30 min bei 37°C unter Luft geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml eiskaltem, wassergesättigtem Methylenchlorid abgestoppt. Die Proben wurden in eine Eis-Wassermischung gestellt. Anschließend wurden die Inkubationsröhrchen 10 sec mit einem Whirlymixer (Fisons, Scientific Apparatus, Loughbourough, Leicestershire) geschüttelt, um das nicht umgesetzte Pregnandiol aus der Inkubationslösung zu extrahieren.

Die Röhrchen wurden nach der Inkubation 30 sec bei 2000 x g zentrifugiert, um eine klare Phasentrennung zu erreichen. 0,5 ml der wässrigen Phase, die das gebildete Glucuronid enthielt, wurden in 12 ml Brays-Szintillationsflüssigkeit gezählt. Die Szintillationsflüssigkeit bestand aus 500 ml Methanol, 100 ml Äthylenglykol, 300 g Naphthalin, 20 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 1 g 1,4-Di-(2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl))-benzol (Dimethyl-POPOP) und 4,12 l Dioxan. Die Proben wurden, wie in 3.3.1. beschrieben, gezählt. Die Zählausbeute für

Tritium betrug 40 %. Es wurden jeweils mindestens 10.000 Impulse gezählt, um den Zählfehler unter 1 % zu halten. Die Daten zur Messung der Kinetik sind unkorrigierte Mittelwerte von Duplikaten; diejenigen zur Untersuchung des Aktivitätsmaximums in Abhängigkeit vom Alter sind Triplikate. Der Blindwert wurde analog den obigen Inkubationsbedingungen durchgeführt. Anstelle der UDPGA-Lösung wurde Inkubationspuffer eingesetzt, um in den gleichen Volumenverhältnissen zu arbeiten.

Die Aktivität des Enzyms wird in nmol gebildetes Pregnandiolglucuronid pro h angegeben. Die spezifische Aktivität ist nmol Glucuronid pro mg Protein pro h. Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry et al. (18) mit trockenem Rinderserumalbumin als Standard durchgeführt. Bei den Untersuchungen zur Bestimmung der Initialgeschwindigkeit wurden konstante Mengen radioaktives Pregnandiol mit steigenden Mengen an nichtradioaktivem Pregnandiol inkubiert. Die bei diesen Untersuchungen gezeichneten Geraden wurden mit Hilfe eines Rechenprogramms für die Abweichung der kleinsten Quadrate mit einem Olivetti P 102 Tischcomputer berechnet.

4. Ergebnisse und Diskussion

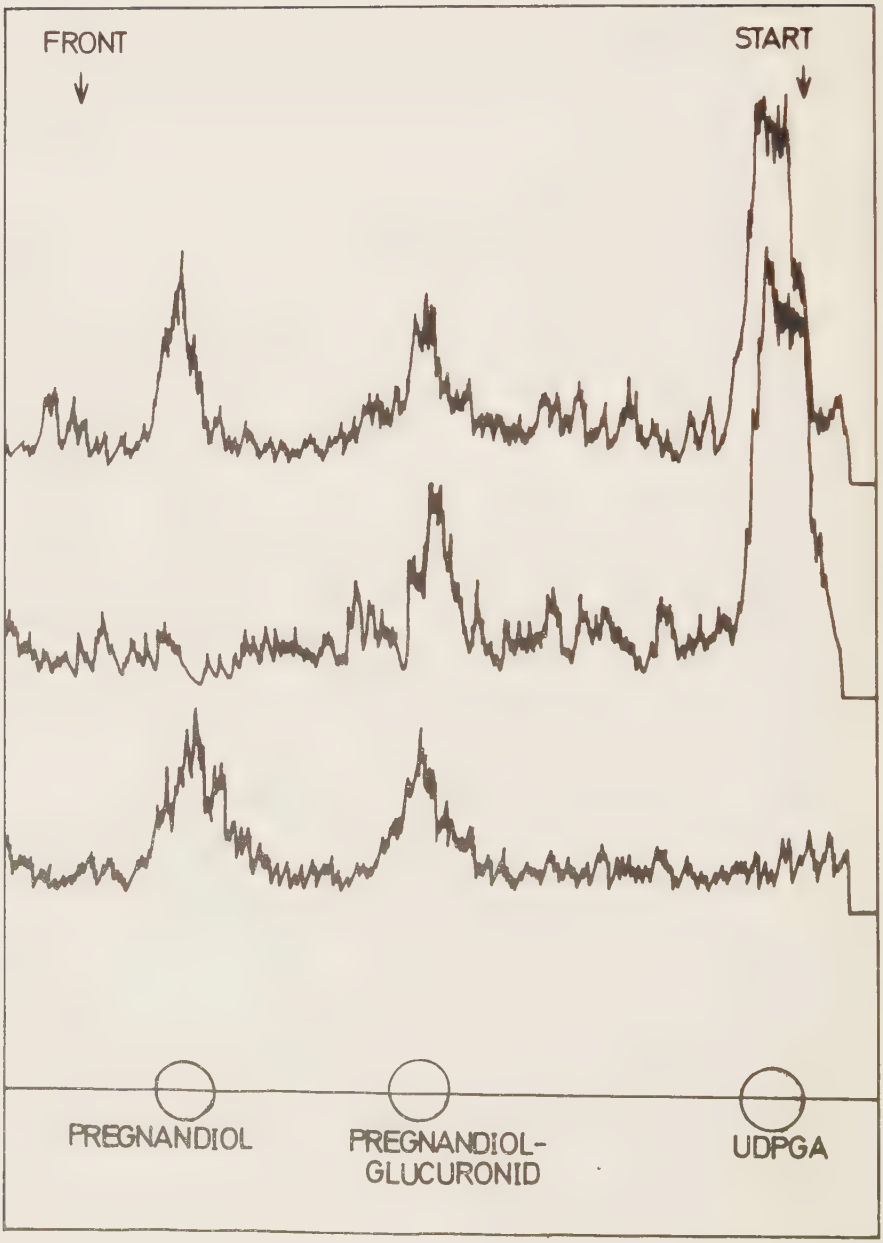
4.1. Nachweis und Kinetik der Glucuronyltransferase

4.1.1. Charakterisierung des gebildeten Pregnandiol-glucuronides

Das nach der Inkubation in Gegenwart von UDPGA und anschließender Extraktion mit Ätylacetat in der wässrigen Phase verbliebene Produkt konnte quantitativ mit n-Butanol extrahiert werden. Bei Inkubation in Abwesenheit von UDPGA wurde im Extrakt keine Radioaktivität nachgewiesen. Nach der Chromatographie des Butanol-Extraktes auf Dünnschichtplatten erschien nur ein radioaktiver Gipfel, der parallel zu einem nicht-radioaktiven Standard von Pregnandiolglucuronid lief. Nach Zugabe von nicht-radioaktivem Standard zum Extrakt stimmte der radioaktive Gipfel genau mit dem nicht-radioaktiven Standard überein. Eine Rechromatographie des Produktes in weiteren dünnschichtchromatographischen Systemen (Chloroform : Äthanol (9:1; v/v); Chloroform : Methanol (5:5; v/v); Chloroform : Methanol : Wasser (5:4:1; v/v/v))erbrachte die gleichen Ergebnisse.

Um einen weiteren Hinweis über die Identität des gebildeten Pregnandiolglucuronides mit dem authentischen Standard zu erhalten, wurde die Doppelisotopenbestimmung durchgeführt. Nach der Chromatographie der Butanolextrakte wurde die in Abb. 1 erhaltene Verteilung der Radioaktivität beobachtet. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, erfolgt im System Chloroform : Methanol (3:7; v/v) eine einwandfreie Auftrennung von [U-^{14}C]-UDPGA (R_F = 0), [1,2-$^{3}H_2$] Pregnandiolglucuronid (R_F = 0,45) und [1,2-$^{3}H_2$] Pregnandiol (R_F = 0,68). Nach Umrechnung und Vergleich von [1,2-$^{3}H_2$] Pregnandiol, bzw. [U-^{14}C] UDPGA wurde für [1,2-$^{3}H_2$] Pregnandiol-[U-^{14}C]glucuronid ein Isotopenverhältnis von 1,1 : 1 errechnet.

Abb. 1. Dünnschichtchromatogramm der erhaltenen Butanol-Extrakte nach Inkubation von Pregnandiol mit UDPGA in Gegenwart von 200 µg Protein der gewaschenen Mikrosomenfraktion. Fließmittel: Methanol : Chloroform (7:3; v/v). (von unten nach oben):
(I) Inkubation von $[1,2\text{-}^{3}H_2]$ Pregnandiol und UDPGA; (II) Inkubation von Pregnandiol mit $[U\text{-}^{14}C]$ UDPGA, (III) Inkubation von $[1,2\text{-}^{3}H_2]$ Pregnandiol mit $[U\text{-}^{14}C]$ UDPGA.


FRONT
START
PREGNANDIOL
PREGNANDIOL-
GLUCURONID
UDPGA

Dieser Wert stimmt gut mit dem Erwartungswert von 1,0 überein. Wurde die Inkubation und Extraktion, wie unter 3.4. beschrieben, durchgeführt, so wurde nach Chromatographie eines n-Butanol-Extraktes der wässrigen Phase nur ein radioaktiver Gipfel erhalten, der genau mit einem zugesetzten Pregnandiolglucuronid-Standard übereinstimmte (Abb. 2).

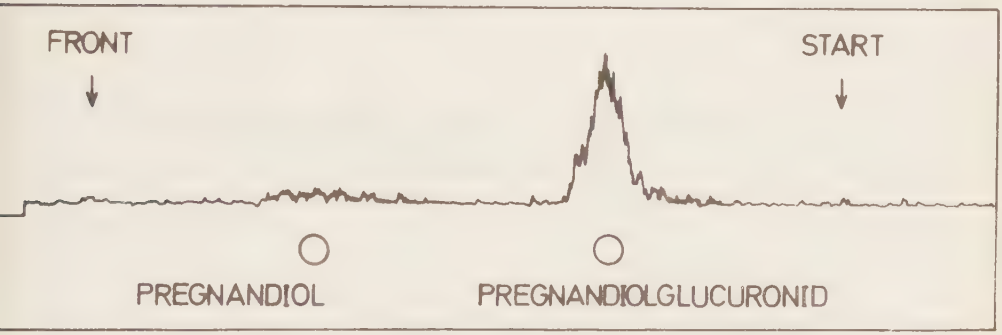


Abb. 2. Dünnschichtchromatogramm der wässrigen Phase (gebildetes Pregnandiolglucuronid) in Chloroform : Methanol (3:7; v/v).

Das gebildete [1,2-$^3H_2$] Pregnandiolglucuronid konnte quantitativ mit ß-Glucuronidase hydrolysiert werden. Nach Dünnschichtchromatographie des Hydrolyse-Produktes im System Chloroform : Methanol (3:7; v/v) wurde ein radioaktiver Gipfel erhalten, der mit dem authentischen Pregnandiol übereinstimmte (Abb. 3).

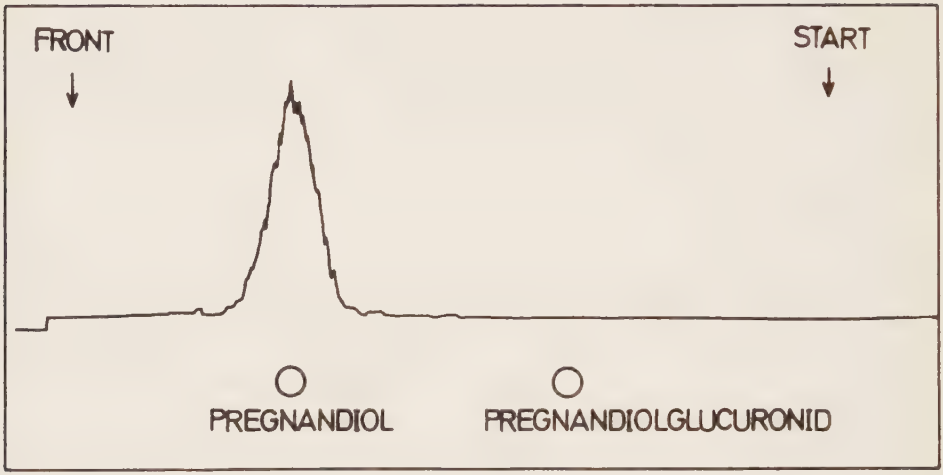


Abb. 3. Dünnschichtchromatogramm des Äthylacetatextraktes nach der ß-Glucuronidase-Spaltung von gebildetem Pregnandiolglucuronid.

Nach Inkubation der Mikrosomenfraktion der Rattenleber entstand somit nur ein radioaktives Produkt, nämlich 5ß-Pregnandiol-3α-glucuronid; Hydroxylierungsreaktionen, bzw. Oxidation oder weitere Reduktion waren unter den gewählten Bedingungen nicht nachweisbar.

4.1.2. Statistische Analyse der Bestimmungsmethode

Das auf diese Weise charakterisierte Produkt Pregnandiolglucuronid ist, wie unter 3.4. beschrieben, schnell und genau zu bestimmen. Der gemessene Blindwert der Reaktion

(Inkubation wie angegeben, jedoch ohne UDPGA) beträgt unter den gewählten Bedingungen etwa 0,5 bis 1 % des Gesamtumsatzes. Unter der Voraussetzung, daß zur Messung der Radioaktivität mindestens 10.000 Impulse gezählt wurden, konnte ein Variationskoeffizient von 2,5 % in Zehnfachbestimmungen erhalten werden. Der dabei gemessene Mittelwert der spezifischen Glucuronyltransferaseaktivität der Leber von geschlechtsreifen, weiblichen Wistar-Ratten beträgt $86 \pm 2{,}1$ (Standardabweichung).

4.1.3. Stabilität des Enzyms

Rattenlebermikrosomen wurden, wie in 3.2. beschrieben, hergestellt. Die Mikrosomensuspension wurde in 10 Portionen bei $-20^{\circ}C$ eingefroren. Die Aktivität des Enzyms Pregnandiol-Glucuronyltransferase wurde vom 1. bis zum 32. Tag bestimmt (Abb. 4).

Die Kurve zeigt, daß durch das Einfrieren und Aufbewahren der Mikrosomenfraktion die Glucuronyltransferaseaktivität nicht zerstört wird. Es wurde dagegen eine deutliche Zunahme der Aktivität nach 15 Tagen beobachtet. Für die folgenden Untersuchungen wurden Enzymfraktionen benutzt, die nicht länger als zwei Monate eingefroren waren. Auch nach diesem Zeitpunkt waren die verwendeten Mikrosomen noch voll aktiv.

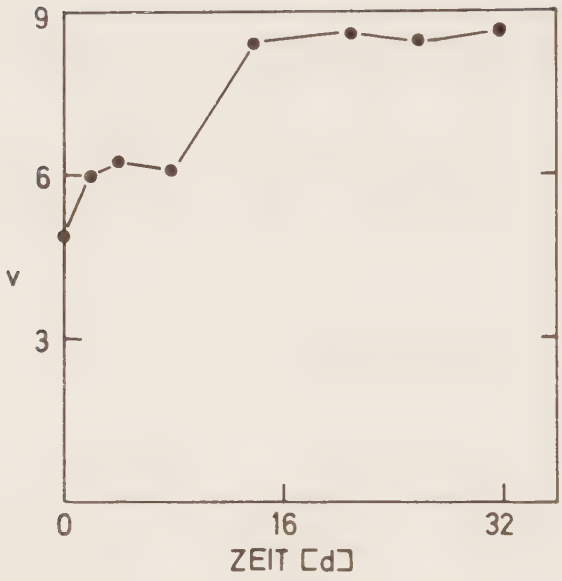


Abb. 4. Aktivität der Glucuronyltransferase in Abhängigkeit der Aufbewahrung bei -20°C. Die Bestimmung erfolgte, wie unter Methoden beschrieben. v bedeutet nmol gebildetes Pregnandiolglucuronid pro 100 µg Protein pro h.

4.1.4. Abhängigkeit der Glucuronidbildung von der Proteinmenge

Die Bildung von Pregnandiolglucuronid in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (10 bis 1000 µg) ist in Abb. 5 dargestellt. Es zeigt sich eine lineare Beziehung zwischen eingesetzter Proteinmenge und entstandenem Glucuronid bis zu 160 µg inkubiertem Eiweiß.

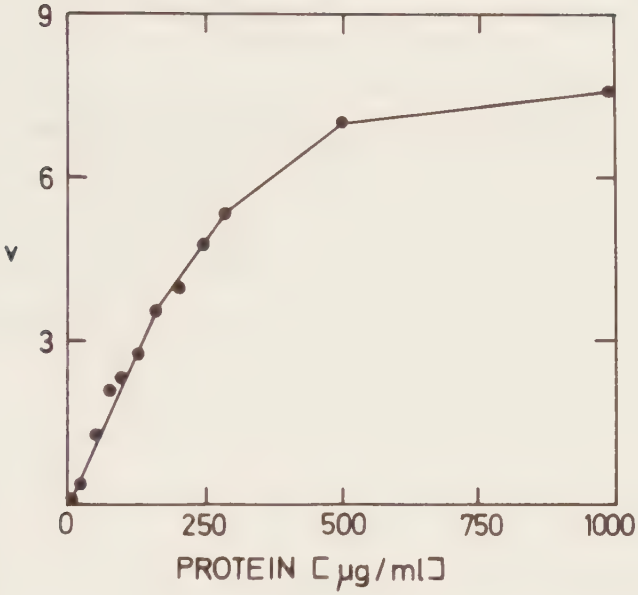


Abb. 5. Abhängigkeit der Glucuronyltransferaseaktivität von der Proteinkonzentration. v bedeutet nmol gebildetes Pregnandiolglucuronid pro h.

4.1.5. Einfluß des pH-Wertes auf die Glucuronidierung

Für diese Untersuchung wurde die Enzymfraktion in 0,25 M Saccharose-Lösung ohne Zusatz von Tris-HCl-Puffer hergestellt und unter den in 3.4. beschriebenen Bedingungen mit verschiedenen Puffern inkubiert. Die maximale Aktivität wurde mit Tris-HCl-Puffer bei pH 8,3 erhalten (Abb. 6). Dieser Wert

liegt im Bereich der für andere Steroidglucuronyltransferasen gefundenen Werte (16, 17). Auch für die Bilirubin-Glucuronyltransferase der Katzenleber wurde ein pH-Optimum erhalten, das im Bereich zwischen 7,3 und 8,4 lag (19).

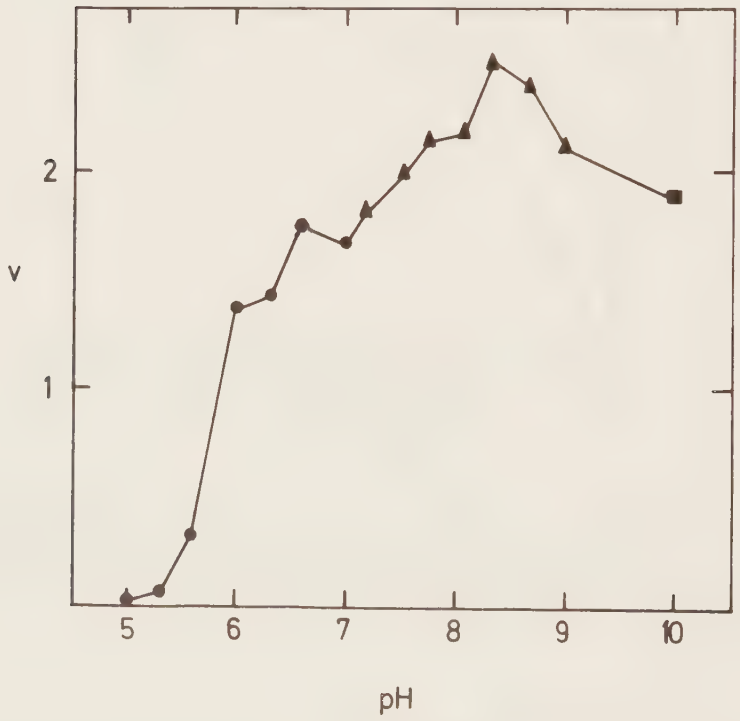


Abb. 6. Abhängigkeit der Glucuronyltransferaseaktivität von verschiedenen Puffern und pH-Werten. v bedeutet nmol gebildetes Pregnandiolglucuronid pro 100 µg Protein pro h. ●——● 0,1 mM Tris-Maleat-Puffer; ▲——▲ , 0,1 mM Tris-HCl-Puffer; ■ ,0,1 mM Glycin-NaOH-Puffer.

4.1.6. Abhängigkeit der Glucuronidierung von der Inkubationszeit

Zur Untersuchung der Proportionalität zwischen Inkubationszeit und Umsatz wurden die Proben für diesen Versuch vor der Inkubation 15 min bei 37°C im Wasserbad äquilibriert. Die Bildung des Pregnandiolglucuronides wurde bis 2 h untersucht und war in diesem Bereich linear. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Proteins gestartet (Abb. 7).

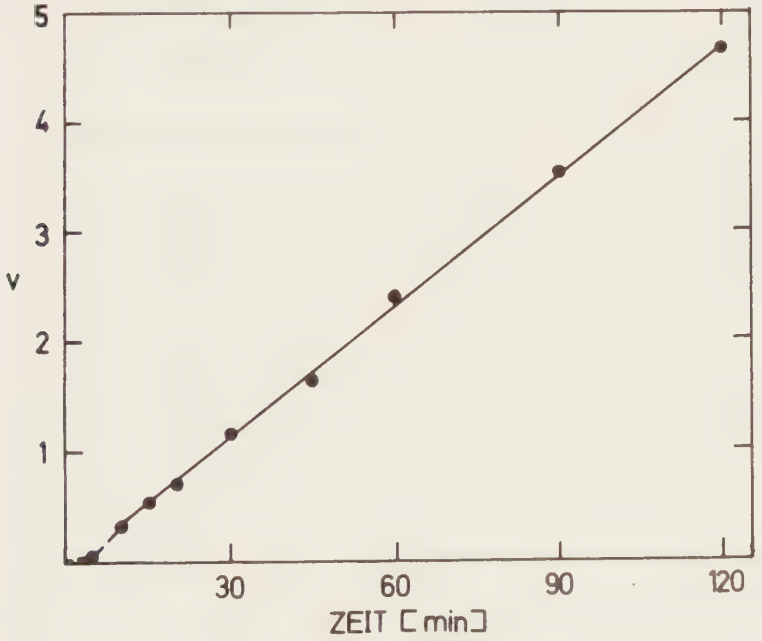


Abb. 7. Abhängigkeit der Glucuronyltransferaseaktivität von der Inkubationszeit. v bedeutet nmol gebildetes Pregnandiolglucuronid pro mg Protein.

4.1.7. Aktivatoren und Inhibitoren

4.1.7.1. Einfluß von Kationen und EDTA

Wie aus Tab. 1 zu entnehmen ist, wird die Pregnandiol-Glucuronyltransferase durch Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+} und Fe^{3+} aktiviert. Cd^{2+}, Hg^{2+} und Zn^{2+} haben einen stark hemmenden Einfluß; Cu^{2+} hemmt in höheren Konzentrationen (10 mM) ebenfalls.

Tab. 1. Einfluß von Metallionen und Komplexbildnern auf die Pregnandiol-Glucuronyltransferase

Metallionen und Komplexbildner	mmol/l	Enzym-Aktivität %
Ohne Zusatz	-	100
Mg^{2+}	1	196
	5	260
	10	288
	20	280
	50	274
Ca^{2+}	1	157
	10	261
	50	258
Fe^{2+}	1	206
	10	261
	50	258
Fe^{3+}	1	133
	10	291
Cd^{2+}	1	82
	10	28
Zn^{2+}	1	0
	10	0
Hg^{2+}	1	30
	10	0
Cu^{2+}	1	119
	10	45
EDTA	0,01	101
	0,1	102
	1,0	106

Die starke Aktivierung durch Mg^{2+}, Ca^{2+} bzw. Fe^{2+} läßt vermuten, daß durch die Gegenwart dieser Ionen die Konformation des Enzyms verändert wird. Es könnte jedoch auch sein, daß diese Kationen die Bildung des Enzymsubstrat-Komplexes fördern. Daß das Vorhandensein dieser Ionen jedoch nicht absolut erforderlich ist, kann aus den Versuchen mit EDTA geschlossen werden. EDTA hat selbst in Konzentrationen von 1 mM keinen Einfluß auf die Reaktion. Bei allen Untersuchungen wurde auf Grund dieser Ergebnisse Mg^{2+} (10 mM) als Aktivator zugesetzt.

4.1.7.2. Einfluß von Sulfhydryl-Reagentien

Wie aus Tab. 2 zu ersehen ist, aktivieren N-Äthylmaleimid und p-Chlormercuribenzoat das Enzym in niedrigen Konzentrationen; pCMB hemmt die Reaktion in höheren Konzentrationen.

Tab. 2. Einfluß von Sulfhydryl-Reagentien auf die Aktivität der Glucuronyltransferase

Reagenz	mmol/l	Enzym-Aktivität %
Ohne Zusatz	-	100
NEM	0,01	163
	0,1	136
	1,0	130
	10,0	120
pCMB	0,01	122
	0,1	127
	1,0	106
	10,0	37
Dithioerythritol	0,01	94
	0,1	83
	1,0	66

Diese Ergebnisse zeigen, daß reduzierte Schwefelgruppen zur Erhaltung der Enzymaktivität nicht notwendig sind. Die Hemmung der Glucuronyltransferase durch p-Chlormercuribenzoat in 10 mM Konzentration ist wahrscheinlich unspezifisch. Diese Vermutungen werden durch die Untersuchungen mit Dithioerythritol, einer Substanz, die -S-S-Gruppen reduziert, bestätigt, da Dithioerythritol in allen untersuchten Konzentrationen (0,01 bis 1 mM) die Reaktion hemmt. Auch der Vergleich der Untersuchungen mit Metallionen zeigt, daß einige zweiwertige Schwermetallionen, wie Fe^{2+}, Cd^{2+} und Cu^{2+} in Konzentrationen von 1 mM die Reaktion nicht vollständig hemmen, aber andere wiederum einen wahrscheinlich unspezifischen Hemmeffekt besitzen (Zn^{2+} und Hg^{2+}).

4.1.7.3. Einfluß von Nukleotiden

Das Enzym wird durch Adenosintriphosphat stimuliert. Die Stimulierung nimmt jedoch über einen Bereich von 0,01 bis 1 mM ATP nur von 52 auf 73 % zu (Tab. 3). Es ist bekannt, daß Rattenlebermikrosomen Pyrophosphatasen enthalten (20), die UDPGA spalten können. Beim Zusatz von ATP könnte dieses UDPGA von der Bindung an die Pyrophosphatasen verdrängen. Dadurch könnte mehr UDPGA für die Reaktion bereitgestellt werden. Es könnte aber auch sein, daß ATP durch Energiebereitstellung einen Einfluß auf dieses komplexe Enzymsystem in der Membran des endoplasmatischen Reticulums hat.

Tab. 3. Einfluß von Nukleotiden auf die Aktivität der Glucuronyltransferase

Nukleotid	mmol/l	Enzym-Aktivität %
Ohne Zusatz	-	100
ATP	0,01	152
	0,1	160
	1,0	173
UDP	0,01	105
	0,1	85
	1,0	96

Bei diesen Ergebnissen fallen einige gravierende Unterschiede zu anderen Arbeiten über Glucuronyltransferasen auf. So fand Rao (7) bei Arbeiten über die Östron-Glucuronyltransferase in der Schweineniere, daß ATP einen schwach hemmenden Effekt auf das Enzym ausübt. In dieser Arbeit wurde auch für Mg^{2+} nur eine schwach stimulierende Wirkung festgestellt (10 mM ergaben eine Stimulierung um 24 %). In derselben Arbeit und auch bei Götze et al. (21) wurde für das Nukleotid UDP, das ein Produkt der Glucuronidierung ist, eine deutliche Hemmung festgestellt. Dies ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen.

Auffällig sind auch im Vergleich mit anderen Arbeiten die Unterschiede in der Wirkung der Sulfhydryl-Reagentien. Bei Rao (7) wurde für alle drei Reagentien ein hemmender Effekt festgestellt, während in der vorliegenden Arbeit insbesondere NEM eine deutliche aktivierende Wirkung zeigt. Für Nichtsteroide wurden von van Roy et al. (22) bei der

Untersuchung einer Bilirubin-Glucuronyltransferase eine starke Stimulierung durch Zusatz von Mg^{2+} gefunden (700 %).

Die bei verschiedenen Untersuchungen beobachteten Unterschiede in der Aktivierung bzw. Hemmung durch Metallionen, Komplexbildner, Sulfhydryl-Reagentien und Nukleotide deuten auf unterschiedliche Glucuronyltransferasen hin, die an der Konjugation verschiedener Aglykone beteiligt sind. Hierbei wurden jedoch neben Steroiden (7,16,17,21) auch Nichtsteroide (22) und Xenobiotica, wie z. B. p-Nitrophenol zur Untersuchung der Glucuronidierung verwendet. Man könnte die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse als einen Hinweis auf die Multiplizität der Glucuronyltransferasen in Betracht ziehen, worauf später noch näher eingegangen werden soll.

4.1.8. Untersuchung von Initialgeschwindigkeiten

Alle Untersuchungen der Initialgeschwindkeiten erfolgten im linearen Bereich der Zeit-, Protein- und Temperaturkurven. Die Untersuchungen wurden mit steigenden Konzentrationen von Pregnandiol bei verschiedenen, konstant gehaltenen UDPGA-Konzentrationen ausgeführt. Die Darstellung der Initialgeschwindigkeiten bei konstant gehaltenen UDPGA-Konzentrationen gegen steigende Mengen Pregnandiol ist in Abb. 8 wiedergegeben. Mit höheren Konzentrationen des konstant gehaltenen Substrates wurde eine Zunahme der Initialgeschwindigkeit beobachtet. Die Auftragung nach Lineweaver und Burk (Abb. 9), nämlich 1/v gegen 1/s der gleichen Datenzusammenstellung wie in Abb. 8, ergibt weiterhin, daß auch die Maximalgeschwindigkeiten mit der Zunahme des konstant gehaltenen Substrates ansteigen. Die aus Abb. 9 mit Hilfe eines Rechenprogramms ermittelten Steigungen der Geraden und die dazugehörigen Maximalgeschwindigkeiten (Reziproke Werte der Ordinatenabschnitte) sind in Abb. 10 in einem Sekundärplot nach Segel (23) aufgetragen. Der in Abb. 10 erhaltene Reziprokwert des Schnittpunktes der aufgetragenen apparenten V-max-Werte (offene Kreise) mit der Y-Achse ergibt den V-max-Wert für die Glucuronidierung von Pregnandiol mit Hilfe der mikrosomalen Glucuronyltransferase der Rattenleber. Der Schnittpunkt mit der Abszisse ergibt $\propto K_{UDPGA}$. Die Auftragung der in Abb. 9 erhaltenen Steigungen (geschlossene Kreise) erlaubt die Berechnung der Michaelis-Menten Konstante für UDPGA der Reaktion. Die erhaltenen kinetischen Daten der Auftragung derselben Werte mit UDPGA als variablem Substrat sind mit den Ergebnissen von Pregnandiol in Tab. 4 zusammengefaßt.

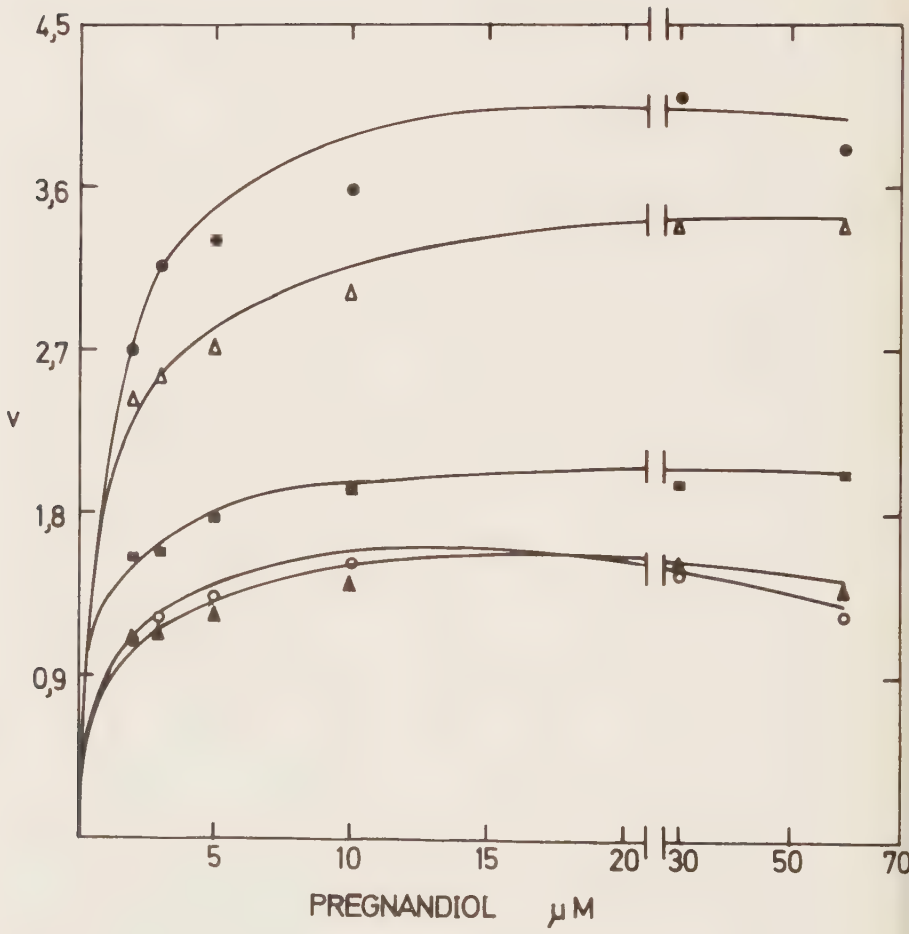


Abb. 8 Initialgeschwindkeiten mit Pregnandiol als variiertem Substrat. v bedeutet nmol gebildetes Pregnandiolglucuronid pro mg Protein pro h. UDPGA: ●——● , 2,0 mM; Δ——Δ , 0,8 mM; ■——■ , 0,2 mM; ○——○ , 0,1 mM; ▲——▲ , 0,066 mM.

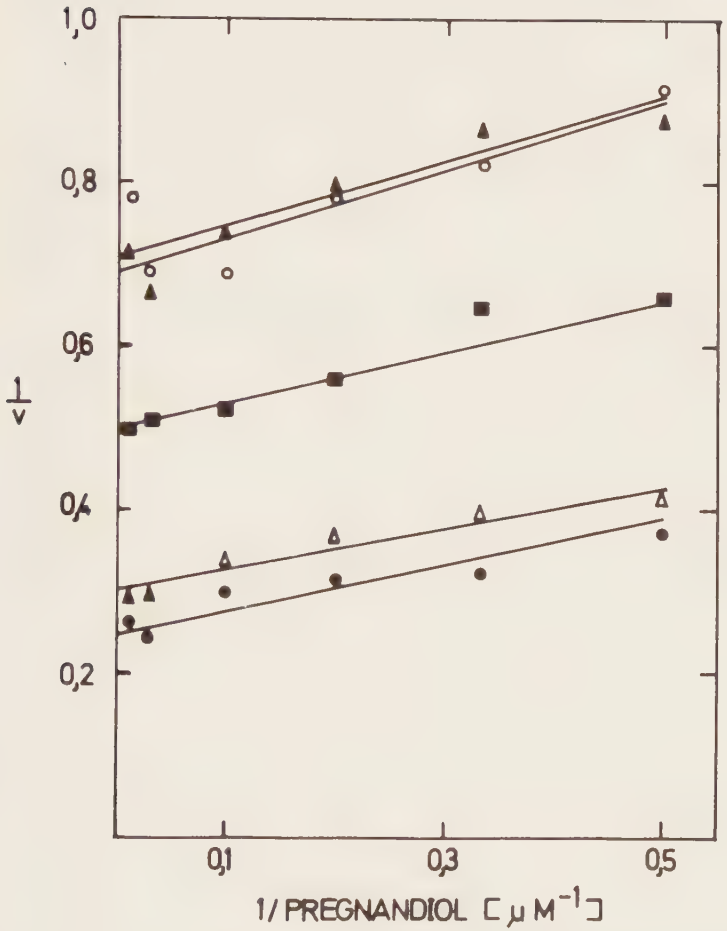


Abb. 9. Reziproke Darstellung von Initialgeschwindigkeiten mit Pregnandiol als variablem Substrat. UDPGA: ●——● , 2,0 mM; Δ——Δ , 0,8 mM; ■——■ , 0,2 mM; o——o , 0,1 mM; ▲——▲ , 0,066 mM.

Tab. 4. Kinetische Daten der Pregnandiol-Glucuronyltransferase

Variiertes Substrat	Pregnandiol	UDPGA
K_M (µM)	0,84	60,8
α K (µM)	0,905	196,0
V-max (µM)	1,37	1,37
α	1,08	3,22
Hillkoeffizient h	1,05	1,33

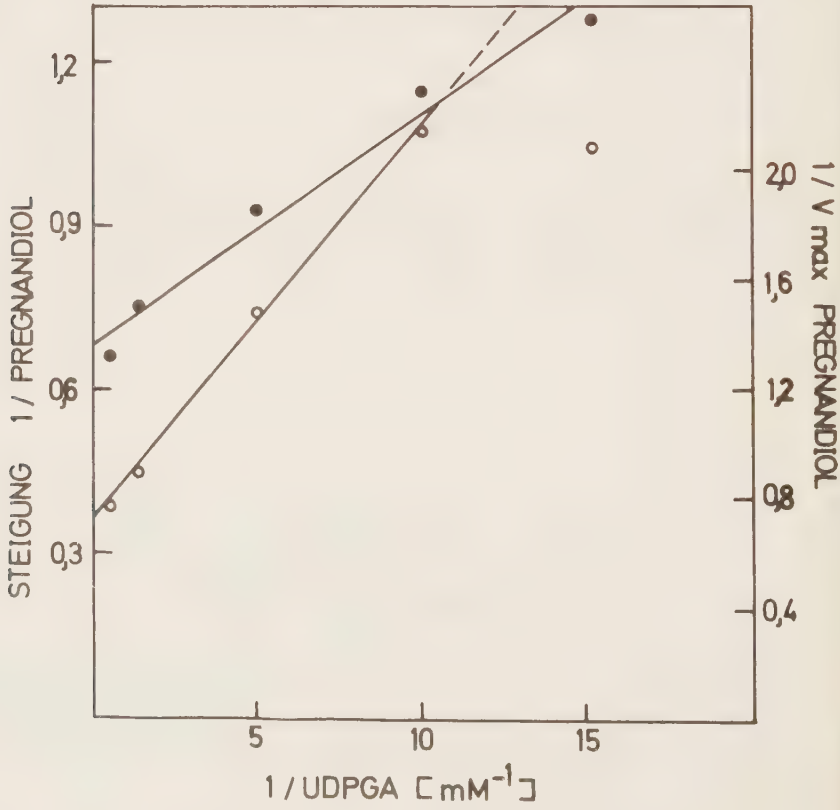


Abb. 10. Sekundärauftragung der Steigungen ●——● und V-max-Werte o——o von Abb. 9 nach Segel (23).

Aus αK und K_M läßt sich der Faktor α berechnen (23). Der Faktor α ist eine Maßzahl für die Beeinflußbarkeit der Affinität eines Substrates zu dem Enzym durch steigende Konzentrationen des zweiten Substrates. Beträgt der Faktor $\alpha = 1$, wie im Falle von Pregnandiol, so bedeutet das, daß bei steigenden Mengen von Pregnandiol die Affinität des zweiten Substrates, UDPGA, zum Enzym nicht verändert wurde. Pregnandiol hat also keinen Einfluß auf die Bindung von UDPGA an das Enzym. Ist der Faktor α größer als eins, wie bei UDPGA, verringern steigende Konzentrationen die Affinität des zweiten Substrates zum Enzym.

In diesem Zusammenhang war es wichtig zu erfahren, ob ein oder mehrere Bindungsstellen für jedes Substrat pro Peptidkette vorhanden sind. Daher wurden die vorliegenden Daten nach Hill (24) transformiert, um Hinweise auf eine vorliegende Kooperativität zu erhalten. Liegt ein Enzym mit mehreren Untereinheiten vor, so erhält man nach Ahlers et al. (25) folgendes Reaktionsschema.

$$E + n(S) \longrightarrow ESn \xrightarrow{k_2} E + P$$

Die Geschwindigkeitsgleichung lautet:

$$V = \frac{V\text{-max} \quad (S)^n}{K_M + (S)^n}$$

diese kann umgeformt und logarithmiert werden:

$$\log (V/V\text{-max} - V) = n\log (S) - \log K_M$$

Wenn log V/V-max-V gegen log (S) aufgetragen wird, erhält man eine Gerade, deren Steigung der Hillkoeffizient h ist (Abb. 11). Dieser Koeffizient entspricht direkt der Zahl der Bindungsstellen am Enzym. Der Hillkoeffizient für Pregnandiol als Substrat beträgt: 1,05; für UDPGA:1,33. Das bedeutet, daß am Enzymkomplex für beide Substrate nur je eine Bindungsstelle vorliegt.

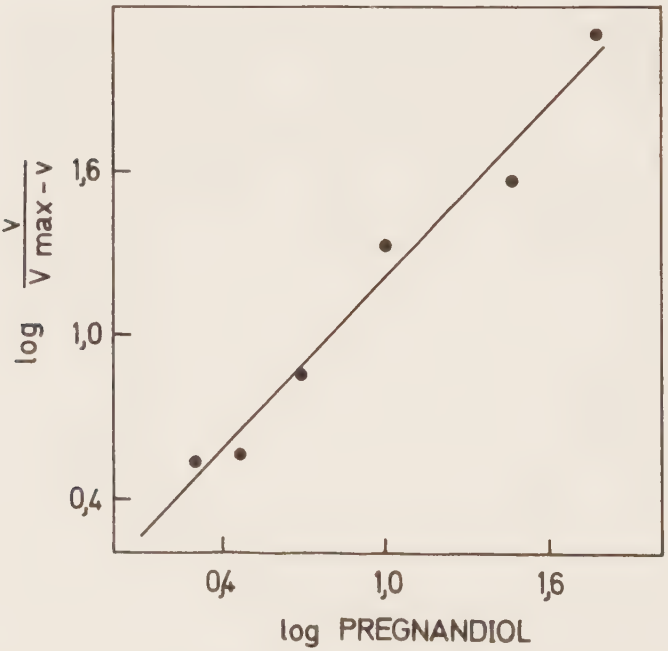


Abb. 11. Hill-Auftragung der Bindung von Pregnandiol für eine Konzentration von 0,2 mM UDPGA. Die errechnete Steigung der Geraden ergibt die Anzahl der Bindungsstellen am Enzym für Pregnandiol.

4.2. Untersuchungen zur Multiplizität der Glucuronyltransferasen

4.2.1. Hemmversuche mit Aglykonen

4.2.1.1. Versuche mit Pregnandiol-strukturanalogen Verbindungen

Zur Untersuchung der Substratspezifität der Pregnandiol-Glucuronyltransferase wurde das Enzym mit mehreren Substratanaloga inkubiert. Es wurden steigende Mengen Pregnandiol jeweils mit 0,2 mM UDPGA in Gegenwart folgender Aglykone untersucht: Östron, Testosteron, Tetrahydrocorticosteron, Ätiocholanolon, 11-Deoxy-tetrahydrocortison, Tetrahydrocortison, Pregnanolon. Östron, Ätiocholanolon, 11-Deoxy-tetrahydrocortison und Pregnanolon hemmen das Enzym kompetitiv. Als Beispiel einer kompetitiven Hemmung wurden die Ergebnisse der Untersuchung mit Östron als Inhibitor in Abb. 12 dargestellt. Alle weiteren Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

Die K_i-Werte, berechnet nach der Formel von Dixon et al. (26) für kompetitive Hemmung:

$$K_i = \frac{i}{\frac{K_p}{K_M} - 1}$$

stimmen nicht mit den K_M-Werten der jeweiligen Kontrollinkubationen überein. Das bedeutet, daß sich Pregnandiol und die Inhibitoren an der gleichen Stelle des Enzyms anlagern. Die K_i-Werte liegen um das drei- (Pregnanolon) bis vierzigfache (Östron) über den K_M-Werten von Pregnandiol.

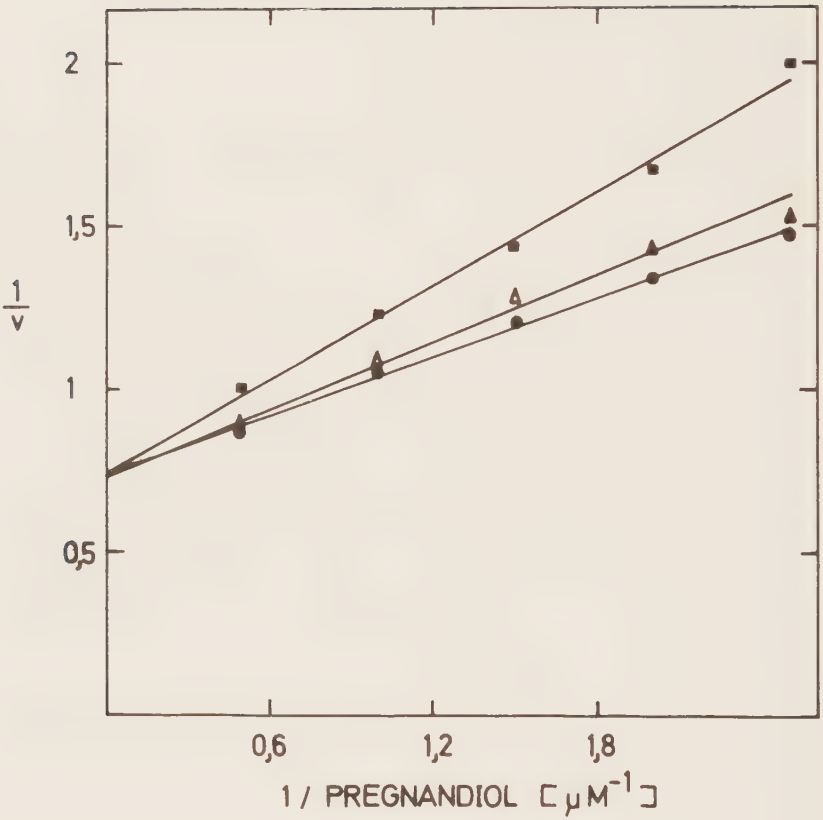


Abb. 12. Reziproke Darstellung der Substratkonzentrationskurve mit Östron als Inhibitor. Die UDPGA-Konzentration betrug 0,2 mM. ●——● ohne Inhibitor; Δ——Δ 1 µM Östron; ■——■ 10 µM Östron.

Obwohl diese Aglykone an derselben Stelle wie Pregnandiol gebunden werden, findet dort keine Glucuronidierung statt. Bei einer Glucuronidierung durch dasselbe Enzym müßte

$K_M = K_i$ sein. Tetrahydrocortison, Tetrahydrocorticosteron und Testosteron haben keinen hemmenden Einfluß auf das Enzym.

Tab. 5. Einfluß von Aglykonen auf die Glucuronidierung von Pregnandiol

Substanz	nM	Art der Hemmung	K_i µM
Östron	1	kompetitiv	10,71
	10	"	16,84
Testosteron	10	-	-
	20	-	-
Tetrahydro-corticosteron	1	-	-
	10	-	-
Tetrahydro-cortison	1	-	-
	10	-	-
Ätiocho-lanolon	1	kompetitiv	1,84
	10	"	5,47
11-Deoxy-tetra-hydrocortison	5	kompetitiv	4,27
	10	"	3,29
Pregnanolon	1	kompetitiv	0,72
	10	"	2,34

Bei Betrachtung der Strukturformeln dieser Steroide fällt auf, daß nur solche, die am C-Atom 11 des Ringgerüstes keine funktionelle Gruppe haben, die Pregnandiol-Glucuronyltransferase kompetitiv hemmen. Eine funktionelle Gruppe in 11-Stellung scheint die Anlagerung des Steroides an das Enzym zu verhindern; das geht insbesondere aus den Ergebnissen mit 11-Deoxy-tetrahydrocortison hervor. Diese Verbindung besitzt als einzigen Unterschied zu Tetrahydrocortison keine Keto-Gruppe am C-Atom 11. Daher kann es wahrscheinlich vom Enzym

an der Stelle des Substrates gebunden werden und so kompetitiv hemmen, während Tetrahydrocortison keinen Einfluß ausübt. Nach dieser Hypothese müßte Testosteron allerdings ebenfalls kompetitiv hemmen. Von allen untersuchten Substraten besitzt nur Testosteron eine Keto-Funktion im Ring A. Zur Bindung der Aglykone ist jedoch wahrscheinlich eine Hydroxyl-Gruppe im Ring A erforderlich, da z. B. Östron ebenfalls gebunden wird und dadurch hemmend wirkt.

Es müssen also nach den obigen Ergebnissen zwei Parameter vorliegen, damit ein Steroidsubstrat an das Enzym gebunden werden kann:
1. Die C-11-Stellung des Ringgerüstes darf nicht besetzt sein.
2. Im Ring A muß eine freie Hydroxyl-Gruppe vorliegen.

4.2.1.2. Hemmversuche mit Bilirubin und Xenobiotica

Bilirubin (Abb. 13) und Phenolphthalein haben eine ausgeprägte nicht-kompetitive Hemmwirkung (Tab. 6), während p-Nitrophenol und o-Aminophenol keinerlei Wirkung auf die Glucuronidierung von Pregnandiol zeigen.

Auch diese Ergebnisse zeigen, wenn man sie mit denjenigen der Östradiol-Glucuronyltransferase des Schweinedünndarmes (6) vergleicht, die durch diese Substanzen kompetitiv gehemmt wurde, daß anscheinend keine einheitliche Form der Glucuronyltransferasen vorliegt, sondern daß jede einzelne ihre spezifischen Substrate besitzt.

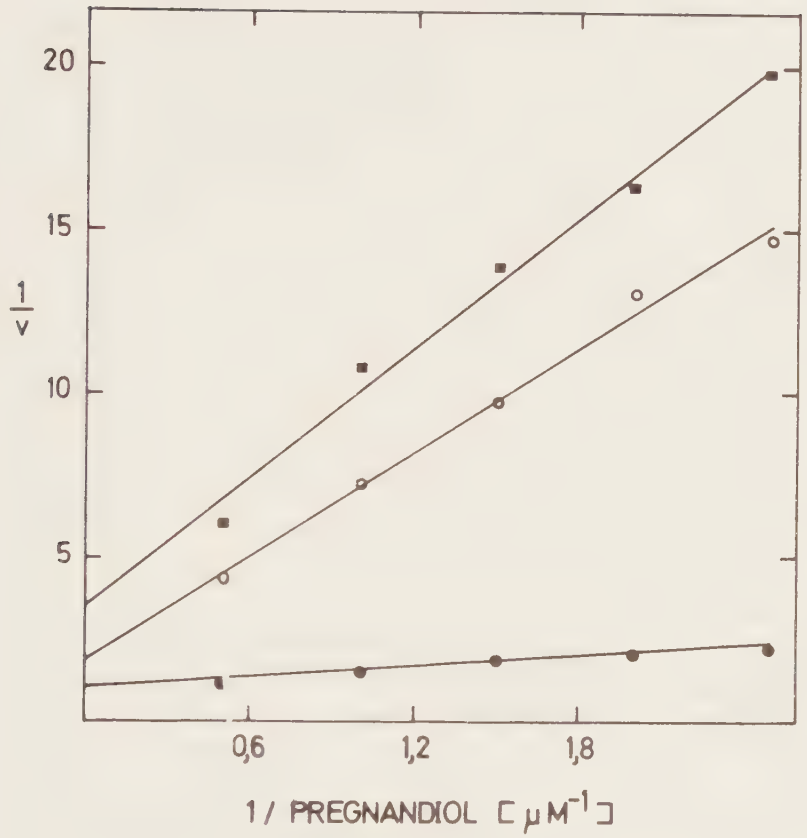


Abb. 13. Darstellung der Substratkonzentrationskurve mit Bilirubin als Inhibitor. Die UDPGA-Konzentration betrug 0,2 mM. ●——● ohne Inhibitor; o——o 10 µM Bilirubin; ■——■ 20 µM Bilirubin.

Die K_i-Werte berechnet nach der Formel für nicht-kompetitive Hemmung (26) sind aus Tab. 6 zu entnehmen.

$$K_i = \frac{i}{\frac{V}{V_p} - 1}$$

Tab. 6. Einfluß von Bilirubin und Xenobiotica auf die Glucuronidierung von Pregnandiol

Substanz	nM	Art der Hemmung	K_i µM
Bilirubin	10	nicht-kompetitiv	11,45
	20	"	8,10
p-Nitro-Phenol	50	-	-
	200	-	-
o-Amino-Phenol	50	-	-
	200	-	-
Phenolphthalein	5	nicht-kompetitiv	7,16
	10	"	6,19
	20	"	29,70

4.2.2. Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Glucuronyltransferase mit Östron, Pregnandiol und Testosteron als Substraten

Die Temperaturkurve wurde über einen Bereich von 5,5 bis 70°C aufgenommen (Abb. 14). Das Aktivitätsmaximum des Enzyms für Pregnandiol lag bei 50°C. Die Aktivierungsenergie wurde nach folgender Formel berechnet:

$$E_a = \frac{2{,}3 \log \frac{K'}{K''} \; R}{\frac{1}{T'} - \frac{1}{T''}}$$

Zeichenerklärung zur Formel für die Aktivierungsenergie:

T'/T'' = Temperatur 1/2 in ^{o}K
K'/K'' = µM/mg Protein bei T'/T''
R = allgemeine Gaskonstante = 1,987 Kcal/^{o}K/mol
E_a = Aktivierungsenergie

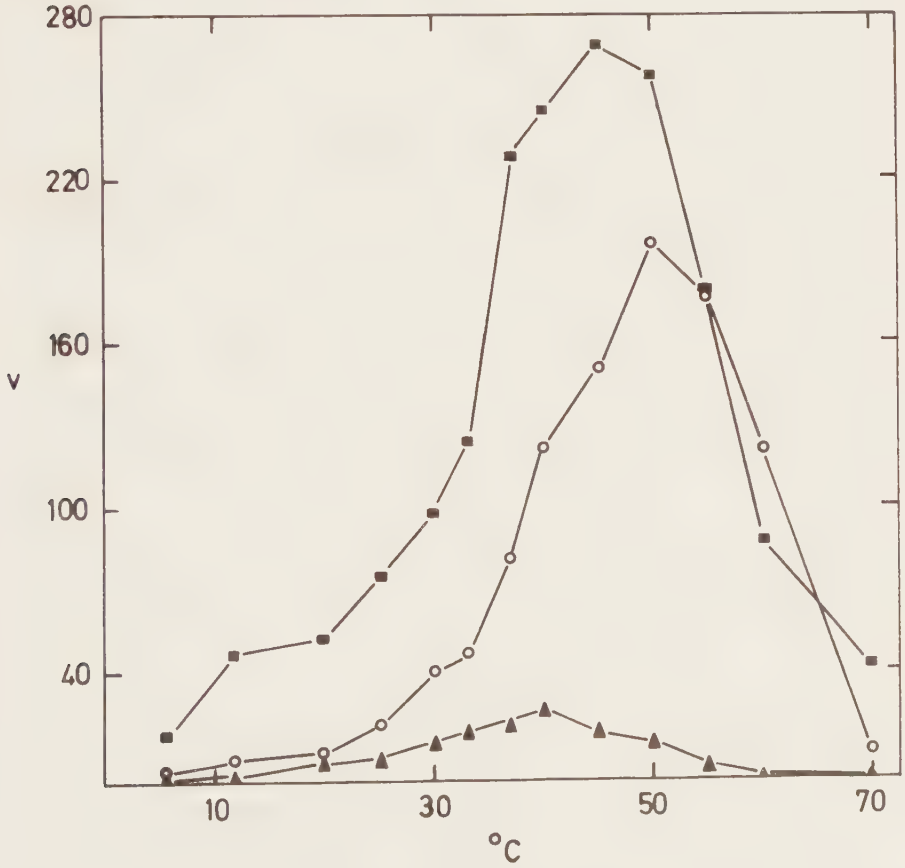


Abb. 14. Bildung von Pregnandiolglucuronid o——o ; Östronglucuronid ▲——▲ ; Testosteronglucuronid ■——■ in Abhängigkeit von der Temperatur. v bedeutet nmol pro mg Protein pro h.

Um einen weiteren Hinweis auf die Spezifität der Pregnandiol-Glucuronyltransferase zu erhalten, wurde bei diesem Versuch auch Östron und Testosteron mit der gleichen Enzympräparation untersucht. Hierzu wurden folgende Inkubationssätze wie in 3.4. beschrieben hergestellt.

a) Inkubation von Testosteron:
Testosteron 600 µM entsprechend 0,1 µCi [4-^{14}C] Testosteron; 0,4 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,3; 0,4 ml UDPGA in Inkubationspuffer gelöst entsprechend einer Endkonzentration von 2,0 mM UDPGA; 0,1 ml $MgCl_2$-Lösung entsprechend 10 mM $MgCl_2$ Endkonzentration; 100 µg Eiweiß der gewaschenen Mikrosomenfraktion in 0,1 ml Aufarbeitungspuffer.

b) Inkubation von Östron:
30 µM Östron entsprechend 0,05 µCi [4-^{14}C] Östron; 0,4 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer,pH 8,3; 0,4 ml UDPGA gelöst in Inkubationspuffer (Endkonzentration 1mM UDPGA); 0,1 ml $MgCl_2$-Lösung entsprechend 10 mM Endkonzentration; 100 µg Eiweiß der gewaschenen Mikrosomenfraktion in 0,1 ml Aufarbeitungspuffer.

Die Aufarbeitung dieser Proben erfolgte nach dem bei Rao et al. (17) beschriebenen Verfahren. Die Inkubationsdauer betrug 20 min bei den in Abb. 14 ersichtlichen Temperaturen.

Wie aus Abb. 14 und Abb. 15 (hier sind die Daten aus Abb. 14 nach Arrhenius transformiert) und aus Tab. 7 zu ersehen ist, liegen für alle drei Substrate verschiedene Aktivitätsmaxima vor; auch die Inaktivierungstemperatur ist jeweils unterschiedlich. Auch die Ergebnisse dieses Versuches, der mit allen drei Substraten unter gleichen Inkubationsbedingungen mit der gleichen Proteinpräparation durchgeführt wurde, zeigen, daß es sich bei der Konjugation dieser Substanzen wahrscheinlich um mehrere von einander deutlich differenzierbare Glucuronyltransferasen handelt. Die aus Tab. 7 ersichtlichen jeweiligen Parameter legen diesen Schluß nahe.

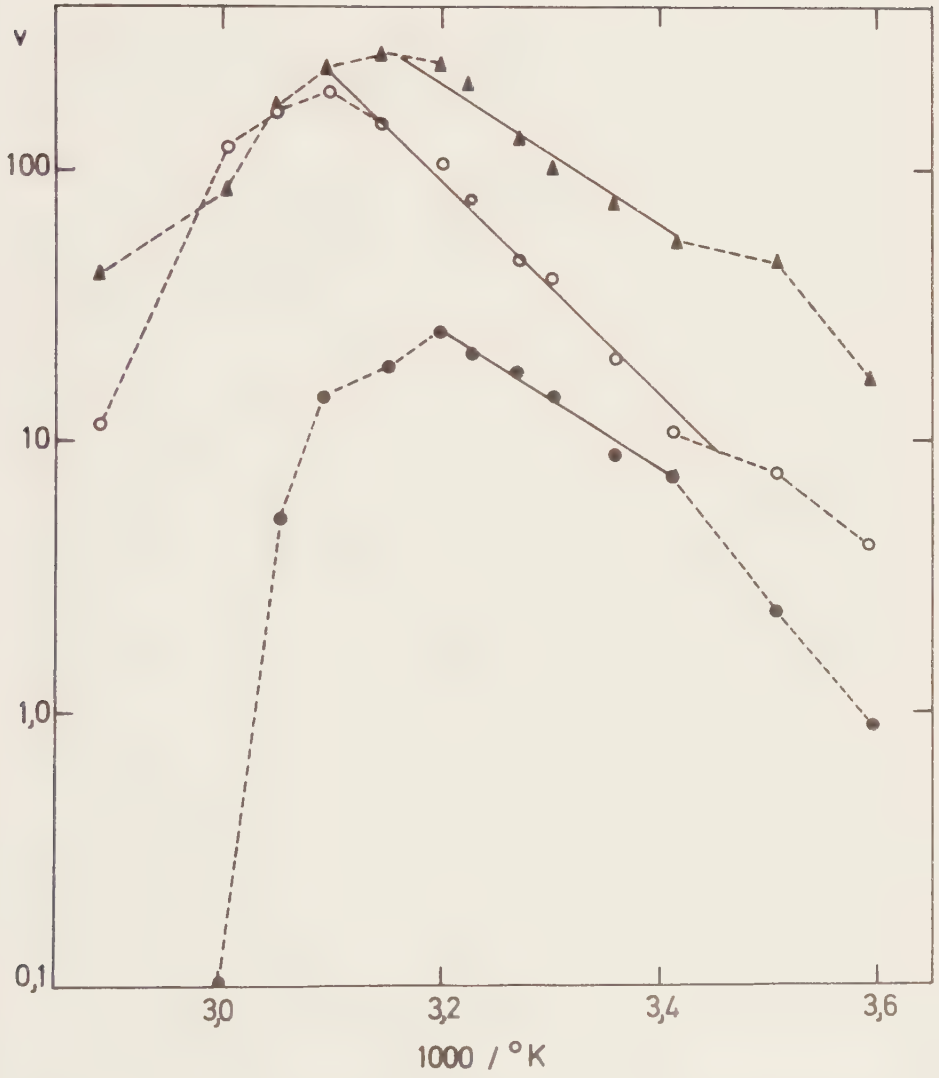


Abb. 15. Transformation der Daten aus Abb. 14 nach Arrhenius.
o——o Pregnandiol; ▲——▲ Testosteron; ●——● Östron.

Tab. 7. Zusammenfassung der Ergebnisse der Temperaturkurve für Pregnandiol, Testosteron und Östron

Substrat	Pregnandiol	Testosteron	Östron
linearer Bereich des Arrheniusplots (°C)	20-45	20-45	20-40
Temperaturoptimum (°C)	50	45	40
V-max (Temperaturoptimum) (nmol/mg Protein/h)	198	270	26,2
Inaktivierungstemperatur (°C)	71	73	60
Aktivierungsenergie (Kcal/°K/mol)	18,0	12,0	11,7

4.2.3. Untersuchung der Altersabhängigkeit der mikrosomalen Glucuronyltransferasen

Um einen weiteren Hinweis auf die Multiplizität der Glucuronyltransferasen zu erhalten, wurde die Entwicklung des (der) Enzyms (e) von der neugeborenen bis zur geschlechtsreifen Ratte untersucht. Hierzu wurden weibliche Wistar-Ratten gezüchtet, deren Glucuronyltransferase-Aktivitäten in bestimmten Zeiträumen (Abb. 16) von 30 min bis zu 85 Tagen nach der Geburt untersucht wurden. Die aus den Lebern der Tiere hergestellte Mikrosomenfraktion wurde mit Pregnandiol, Östron, Testosteron, wie in 3.4. bzw. 4.2.2. beschrieben, inkubiert. Die Bilirubinglucuronidierung wurde wie bei van Roy et al. (22), modifiziert nach einem Assay von Mulder (27), bestimmt. Vom ersten bis zum zehnten Tag wurden pro Untersuchung je vier Ratten getötet, die Lebern vereinigt und zusammen homogenisiert, ab dem 13. Tag jeweils drei Tiere. Abb. 16 zeigt eine eindeutig unterschiedliche Entwicklung für die vier untersuchten Substrate. Wie aus Tab. 8 hervorgeht, reifen die Glucuronyltransferasen der verschiedenen Aglykone in verschiedenen Altersstufen zur vollen Aktivität heran. Besonders auffällig ist die zweiphasige Entwicklung für Pregnandiol. Dies könnte folgende Ursachen haben: Von Tag 33 - 42 ist der erste signifikante Anstieg der Pregnandiol-Glucuronyltransferaseaktivität zu sehen. Dieser Entwicklungszeitpunkt fällt nach Schmidt (28) mit dem Ovulationsbeginn zusammen. Der zweite deutliche Anstieg liegt nach 60 Tagen, er fällt nach Hagemann et al. (29) mit dem Beginn der Geschlechtsreife zusammen.

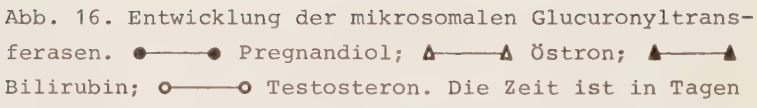


Abb. 16. Entwicklung der mikrosomalen Glucuronyltransferasen. ●——● Pregnandiol; ▲——▲ Östron; ▲——▲ Bilirubin; o——o Testosteron. Die Zeit ist in Tagen angegeben. v bedeutet nmol pro mg Protein pro h. Linke Skalenseite für Pregnandiol, Östron und Bilirubin; rechte Seite für Testosteron.

ZEIT [s]
90
75
60
45
30
15
90
180
270
360
ν
50
100
150

Tab. 8. Entwicklung der Aktivität der Glucuronyltransferasen in Abhängigkeit vom Alter

Substrat	30 min post partum nmol/mg Protein/h	Tag der vollen Aktivität	volle spezif. Aktivität
Pregnandiol	5,6	65	128
Östron	0	21	26,9
Bilirubin	7,2	21	50
Testosteron	82,4	37	466

Die Tab. 8 zeigt, daß sowohl die spezifischen Aktivitäten als auch die Entwicklung der Aktivität der Glucuronyltransferasen stark differieren. Diese Versuche lassen die Vermutung zu, daß es sich in dem Falle der mikrosomalen Glucuronyltransferasen der Rattenleber mit großer Wahrscheinlichkeit um vier verschiedene Enzyme für die vier untersuchten Substrate handelt.

5. Schlußfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde an Hand der Pregnandiolglucuronidierung versucht, die Multiplizität der Glucuronyltransferasen insbesondere in Bezug auf die Substratspezifität gegenüber anderen Steroiden zu untersuchen.

Dabei lassen sich mehrere Ergebnisse herausstellen. Wie die Hemmversuche ergaben, ist die Aktivität der Pregnandiol-Glucuronyltransferase spezifisch durch die Struktur des hemmenden Aglykons zu beeinflussen, d. h. Steroide mit einer funktionellen Gruppe am C-Atom 11 haben keinen Einfluß auf die Pregnandiol-Glucuronyltransferase. Außerdem scheint das Enzym spezifisch am C-Atom 3 zu glucuronidieren, da es nur solche Steroide, die im Ring A eine Hydroxylgruppe besitzen, binden kann, was aus dem Hemmversuch mit Testosteron abzuleiten ist.

Bilirubin wurde als weiteres biologisches Substrat untersucht. Der hier vorliegende nicht-kompetitive Hemmechanismus besitzt möglicherweise eine wichtige klinische Relevanz. Wie von Arias et al. (8,9,10) festgestellt wurde, hat Pregnandiol einen Einfluß auf die Entstehung des Icterus neonatorum in der Weise, daß bei Frauen mit vermehrter Pregnandiolausscheidung über die Muttermilch ein Icterus entstehen kann. Arias hat dabei festgestellt, daß Pregnandiol der auslösende Faktor für die Hemmung der Bilirubin-Glucuronyltransferase ist. Nach seinen Befunden führt die auf Grund der Hemmwirkung verminderte Bilirubin-Konjugation zu einem Anstieg des nicht konjugierten Bilirubin im Blut.

Obwohl die Übertragung tierexperimenteller Untersuchungen auf den Menschen problematisch ist, könnten die in dieser Arbeit

gefundenen Ergebnisse die Pathobiochemie des Icterus neonatorum weiter aufklären.

1. Pregnandiol wird von der juvenilen Ratte nur wenig konjugiert.
2. Die Aktivität der Bilirubin-Glucuronyltransferase ist während dieses Entwicklungszeitpunktes ebenfalls sehr gering.
3. Bilirubin hemmt die Pregnandiol-Glucuronyltransferase nicht-kompetitiv sehr stark.

Hieraus lassen sich folgende Schlüsse ziehen.
Die mit der Muttermilch der noch unreifen Leber angebotenen Pregnandiolmengen können wegen der geringen Aktivität der Pregnandiol-Glucuronyltransferase nicht ausgeschieden werden; sie wirken hemmend auf die Bilirubin-Glucuronyltransferase. Diese hat zudem in diesem Zeitpunkt ihr Aktivitätsmaximum noch nicht erreicht. Das dadurch vermehrt vorliegende nicht konjugierte Bilirubin hemmt seinerseits die Pregnandiol-Glucuronyltransferase. Dieser Mechanismus der gegenseitigen Hemmung von Pregnandiol und Bilirubin könnte eine Erklärung des Icterus neonatorum darstellen.

Es wäre interessant, in weiteren Untersuchungen durch Stimulation trächtiger Ratten mit Progesteron, das der wesentliche Präcursor für Pregnandiol im Stoffwechsel ist, oder durch Stimulation mit Pregnandiol selbst zu untersuchen, ob die jungen Ratten unter diesen Bedingungen zu einem juvenilen Icterus kommen.

An diesem Modell der "unfertigen" Transferaseaktivität ließen sich aber auch interessante Stimulations- bzw. Induktionsversuche durchführen, insbesondere mit der Pregnandiol-Glucuronyltransferase, die ihre normale Aktivität erst nach 60 - 65 Lebenstagen erreicht.

Letztendlich wären auch Untersuchungen möglich, die einen weiteren Aufschluß über die Multiplizität der Steroid-Glucuronyltransferasen geben könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde für die drei Steroide Pregnandiol, Testosteron und Östron gezeigt, daß die altersabhängige Entwicklung der diese Substrate glucuronidierenden Enzyme völlig verschieden abläuft. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß es sich entweder um verschiedene Enzyme handelt, die teilweise bei der Geburt noch nicht vorhanden sind, oder, daß die Enzyme zu diesem Zeitpunkt in einer inaktiven Form vorliegen und durch gewisse Einflüsse oder Aktivatoren in eine aktive Form erst überführt werden müssen.

6. Literaturverzeichnis

1. Zakim, D., Goldenberg, J. and Vessey, A. D. (1973) Eur. J. Biochem. 38, 59 - 63.
2. Le Grande, C. E., Newcomer, W. St. (1964) Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 116, 613 - 617.
3. Miller, K. W., Heath, E. C., Easton, K. H. und Dingell, J. V. (1973) Biochem. Pharmacol. 22, 2319 - 2327.
4. Drucker, W. (1968) Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 129(1), 308 - 311.
5. Rao, G. S., Rao, M. L., Haueter, G. und Breuer, H. (1974) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 881 - 890.
6. Vollrath, W. (1974) Dissertationen, Universität Bonn.
7. Rao, M. L. (1975) Diplomarbeit, Universität Bonn.
8. Arias, J. M., Gartner, L. M., Seifert, S. und Furman, M. (1964) J. clin. Invest. 43, 2037.
9. Arias, J. M., Gartner, L. M., Seifert, S. und Furman, M. (1963) J. clin. Invest. 42, 913.
10. Arias, J. M. und Gartner, L. M. (1964) Nature, 203, 1292.
11. Diczfalusy, E., Menini, E., Tillinger, K. G. und Westman, A. (1957) Acta Endocrinol. 26, 303.
12. Diczfalusy, E., Menini, E., Tillinger, K. G. und Westman, A. (1957) Acta Endocrinol. 26, 313.
13. Adlard, B. P. und Lathe, G. A. (1970) Arch. Dis. Childh. 45, 186.
14. Dutton, G. J. (1971) Handbook of Experimental Pharmacology XXVIII 2 Edit. Brodie, B. B. und Gilette, J. R. Springer Verlag Berlin.

15. Hübner, Ch. F., Overman, R. S. und Link, K. P. (1944) J. Biol. Chem. 155, 615.

16. Rao, G. S. und Breuer, H. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5521 - 5527.

17. Rao, G. S., Haueter, G., Rao, M. L. und Breuer, H. Analytical Biochem. im Druck.

18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.

19. Jansen, P. L. M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 338, 170 - 182.

20. Pogell, B. M. und Leloir, L. F. (1961) J. Biol. Chem. 236, 293.

21. Götze, W., Grube, E., Rao, G. S., Rao, M. L. und Breuer, H. (1971) Hoppe Seyler's, Z. Physiol. Chem. 352, 1223 - 1226.

22. Van Roy, F. P. und Heirwegh, K. P. M. (1968) Biochem. J. 107, 507 - 518.

23. Segel, J. H. (1975) Enzyme Kinetics, J. Wiley & Sons, New York, USA.

24. Hill, A.V. (1910) J. physiol. (London) 40, 190.

25. Ahlers, J., Arnold, A., v. Döhren, Fr. R. und Peter, H.W. (1974) Enzymkinetik, Fischer Verlag, Stuttgart.

26. Dixon, E. C., Webb, M. A. Enzymes 2. Auflage (1964), Academic Press Inc., Publishers New York, USA.

27. Mulder, G. J. (1972) Biochim. Biophys. Acta 289, 284 - 292.

28. Schmidt, G. Kleinsäuger (1973) Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

29. Hagemann, E. und Schmidt, G. Ratte und Maus (1960) W. de Gruyter Verlag, Berlin, 16 - 18.

Lebenslauf

6. 2. 1949	Geboren in Koblenz Vater: Dr. iur. Wilhelm Fuchs, Kaufmann Mutter: Irmgard Fuchs geb. Lütke
1955 - 1959	Volksschule in Koblenz
1959 - 1967	Humanistisches Görres-Gymnasium in Koblenz
20. 6. 1967	Abitur
13. 2. 1968	Tod meiner Mutter
1967 - 1969	Praktikum in der Adler-Apotheke in Koblenz unter der Leitung von Herrn Dr. R. Mosler
21. 7. 1969	Pharmazeutische Vorprüfung in Koblenz
WS 1969 - SS 1973	Pharmaziestudium an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen
WS 1972	Beginn des Studiums der Humanmedizin
19. 3. 1973	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
9.10. 1973	Pharmazeutische Staatsprüfung
24.12. 1973	Approbation als Apotheker
4. 2. 1974	Tod meines Vaters
4. 5. 1974	Eheschließung mit der Apothekerin Hildegard Caratiola

13. 5. 1974	Ärztliche Vorprüfung
WS 1974	Wechsel an die Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
25. 3. 1975	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1975	Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Klinische Biochemie der Universität Bonn